

キクの組織培養(第1報)

器官形成に関する品種間差異

宮崎 貞巳・田代 洋丞・島田 恒治

(蔬菜・花卉園芸学教室)

昭和50年9月18日 受理

Tissue Culture of *Chrysanthemum morifolium* RAMAT. (Part I)
Cultivar differences in organ formation

Sadami MIYAZAKI, Yōsuke TASHIRO and Tsuneji SHIMADA

(Laboratory of Olericulture and Floriculture)

Received September 18, 1975

Summary

In vitro culture of stem segments was carried out on 24 cultivars of *Chrysanthemum morifolium* to examine differences in organ formation among them.

The effect of growth regulators was examined on three cultivars, namely 'Kayō-no-sakura' and 'Ki-amagahara' with medium sized flowers and 'Azumajishi', a large-flowered form. Internodal stem segments excised from the plant were cultured on MS medium supplemented with different concentrations of IAA or NAA and kinetin, either alone or in various combinations. The stem segments of the other 21 cultivars were cultured on MS medium with 3 mg/l IAA and 1 mg/l kinetin, which was recognized as one of the suitable combinations in the above experiment.

1. When cultured on the medium with only IAA or kinetin added, the former three cultivars formed neither shoot nor root on the segments. On the medium with IAA and kinetin in combinations, however, shoot development was observed in the two medium-flowered cultivars, but not in the large-flowered 'Azumajishi'. The explants of 'Kayō-no-sakura' differentiated one or more shoots on all the media with 16 kinds of IAA and kinetin combinations tested, whereas in 'Ki-amagahara' shoot formation was found only on two of the combinations. When NAA was combined with kinetin, on the other hand, rooting was observed, but shoot formation was to some extent inhibited.

2. Among the other 21 cultivars, including 3 large-, 14 medium- and 4 small-flowered forms, none of the large-flowered ones showed any shoot or root development on their explants, while shoot formation was observed in 5 members of medium-flowered and 2 of small-flowered cultivars. No explant showed only rooting without shoot development.

3. The above results suggest that in the chrysanthemum plant shoot formation *in vitro* may have some relationship to shoot branching behavior under natural conditions, which is more prevalent in the small- and medium-flowered cultivars than in the large-flowered ones.

I. 緒 言

植物組織培養法は各種の植物を材料として種々の分野の研究に利用されている³⁾⁸⁾¹⁶⁾²¹⁾。組織

培養法の園芸分野における応用場面としては、(1) 繁殖、(2) 無病苗の作出、(3) 品種改良などがあげられる。既に、ラン類の増殖やカーネーションの無病苗の作出・増殖は企業化されている¹⁶⁾。

栽培ギクの繁殖は通常さし芽で容易に行なわれているが、組織培養法を援用するとその増殖率が極めて高くなる。更に、培養物として茎頂を用いた場合には無病苗を作出することも可能となるために、組織培養法の利用性は極めて高くなることが指摘されている⁵⁾。

一方、組織培養によって生じた株の中にはキクをはじめ、多くの植物で変異株が出現することが報告されている²⁾⁷⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁷⁾。従って、組織培養法は無性繁殖の主要な目的の一つである遺伝性の均一な個体を多数獲得する点では若干不利な面があるが、組織培養によって生じた変異株を育種に利用できる有利な面もある。

本研究は、組織培養法を栽培ギクの繁殖と育種の両面に利用しようという観点から、それらの基礎的知見を得る目的で、(1) 培地の化学的組成・物理的性質、(2) 培養環境条件、(3) 供試品種・植付け切片の選択、(4) 継代培養、(5) 器官形成の組織学、(6) 培養生株の変異性、(7) 変異株の積極的作出法などの諸問題について検討を加えたものである。若干の結果が得られたので逐次報告することにする。

本報では、上記諸問題の検討のための植物材料となる品種の選択を含めて、現在我が国で栽培されている品種の中から代表的系統・品種を選び、器官形成に関する品種間の差異について検討を行った。

II. 実験材料および方法

供試したキクのうち、大輪系品種を除いたすべての品種は1968年に岐阜大学農学部遠藤元庸博士（現岩手大学農学部）から分譲を受け、従来から本学圃場で栽培していた大輪系品種とともに栽培を続けてきたものである。

生長調節物質の種類・濃度・組合せ処理に対する各品種の器官形成反応を調べるために、次の実験を行なった。

実験1, 2: 大輪系1品種と中輪系2品種の節間茎横断切片を IAA および kinetin の単独あるいは組合せ添加培地で培養。

実験3: 大輪系1品種と中輪系2品種の節間茎横断切片を NAA および kinetin の組合せ添加培地で培養。

実験4: 大・中・小輪系21品種の節間茎横断切片を 3mg/l IAA と 1mg/l kinetin の組合せ添加培地で培養。

供試品種: 実験1, 2, 3に供試した品種は中輪切花用の「華陽の桜」・「黄天が原」および大輪大掴の「東獅子」で、実験4では大輪厚物の「百年雪」・「高原の雲」、大掴の「大津波」、中輪切花用の「浅夢」・「銀閣」・「銀笛」・「松の雪」・「みの黄金」・「都梅」・「日本晴」・「オリフラム」、精興美山、料理用ギクの「もってのほか」、江戸ギクの「清水の池」、肥後ギクの「春日姫」、伊勢ギクの「美紅」、嵯峨ギクの「嵯峨の庵」および小輪切花用の「黄あり」・「村の宝」、文人ギクの「初日の出」、クッシュ・マムの「レッド・スター」の計24品種であった。

親株の栽培: 実験1では1974年4月23日に、前年に15cm 鉢および30cm 鉢で栽培した株からさし穂を採集してさし芽し、3週間後に鉢上げして6日後に摘心し、3本仕立として栽培した。実験2では、実験1（培養開始: 7月15日）に供試した親株群を翌日に切りもどし3本仕立として栽培した。実験3では、実験2（培養開始: 9月23日）で供試した親株群を翌日に切りもどし、

3本仕立として栽培した。実験4では、前年に15cm鉢で栽培した株から1975年4月18日にさし穂を採集してさし芽し、3週間後に鉢上げて5日後に摘心し、3本仕立として栽培した。それぞれの実験に供試した親株群はガラス室の16時間日長下で栽培した。

植付け切片の調製：各茎の最も若い展開葉着生節から下方へ数えて第3節と第4節の節間茎を横断して4切片（実験4では2切片）を調製した。各実験区における植付け切片の大きさは第1表の通りである。

茎の殺菌：植付け切片を調製するに先立って茎の殺菌を行った。殺菌は、0.1%昇汞水に展着剤としてTween20を0.1%添加した殺菌液に、第2節下部と第5節上部の間の茎を入れ、攪拌しながら3分間行った。殺菌後は滅菌水で3回水洗した。

キクの茎横断切片は切断後放置すると切口が次第に褐色となり、やがて全体が褐変する。特に高温期にはその傾向が強い。従って、高温期にキクの組織培養を行う場合には殺菌液や殺菌液の洗浄に用いる滅菌水を冷却して使用し、茎を切断した後は速やかに植付けなければ褐変する切片が多くなる。

培地の調製：培地には基本培地に Murashige and Skoog の培地（MS 培地）を用い、無機塩類と蔗糖を所定の半量の蒸留水に溶解後、1規定の NaOH および HCl で pH を 5.5 に調整した。一方、所定の半量の蒸留水に粉末寒天を加えて 120°C で融解後、上記の無機塩類・蔗糖液を攪拌しながら加え、30×150mm 試験管に 20ml づつ分注してアルミホイルで栓をした。IAA および NAA は無水アルコールに、kinetin と有機微量要素は 0.05 規定の NaOH に溶解し、これらの溶液を混合して、ザイツの滅菌ろ過器で滅菌した。この滅菌混合液 0.1ml を上記の寒天培地を 120°C で 15 分間オートグレイブした後、培地が凝固する前に添加した。各実験区に用いた生長調節物質の濃度および組合せは第1表の通りである。

培養条件：培養は 28°±1.5°C、約 3,000lux、16時間日長のコイトロン KB-10S 型のグロース・キャビネットで8週間行った。

調査：培養開始後8週間まで毎週シュート発生切片数、シュート発生数、シュート発生部位、シュート発生時期、根発生切片数、発根数、発根部位、発根時期、褐変切片数、褐変時期について調査した。本報掲載の表では培養8週間後の培養打ち切り時の結果を示した。

なお、培養物に生じたシュートや根の形成様相などについては「実験結果」の項に詳記するが、実験結果を表記する上に必要な用語の説明を略記する。

形成されたシュートには2種類（アブノーマル・シュートとノーマル・シュート）が観察された。表では、シュートの一方だけあるいは両方を形成した植付け切片をシュート発生切片とした。

根の形成については、3種類のタイプが観察され、シュートに関連して形成されたと考えられた場合（2種類）と、シュートの形成とは関係なく根だけが生じた場合とがあった。表示した発根切片とは、根だけが形成された切片である。

また、表示した褐変切片は、「茎の殺菌」の項で述べたように、植付切片の取り扱いに注意を払ったにもかかわらず褐変した切片である。

III. 実験結果

本実験は、24品種のキクについて、その茎の節間の横断切片を kinetin と IAA または NAA を組合せて添加した MS 培地に植付け、それらの培養物の器官形成の様相を調べたものであるが、実験区別にその形成様相について述べるに先立って、4種の実験を通じての観察として、シュートと根の出現様相を述べたい。

Table 1. Materials and culture media.

Experiments	Cultivars	Explant source	Fresh weight mg.	Length mm.	Diameter mm.	Basal medium	Growth regulators mg/l
1	Kayō-no-sakura	Internodal stem*	12.2	2.2	4.1	MS	IAA 0, 0.5, 1.0, 3.0 Kinetin 0, 0.5, 1.0, 3.0
	Ki-amagahara		10.5	1.9	3.4		
	Azumajishi		10.9	1.5	3.9		
2	Kayō-no-sakura	Internodal stem*	17.3	1.8	4.5	MS	IAA 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 Kinetin 1/10, 1/5, 1/3, 1/2 of each IAA conc.
	Ki-amagahara		12.3	1.7	4.1		
	Azumajishi		12.3	1.9	3.9		
3	Kayō-no-sakura	Internodal stem*	14.7	1.4	4.1	MS	NAA 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 Kinetin 1/10, 1/5, 1/2, 1.0 of each NAA conc.
	Ki-amagahara		17.5	1.3	4.1		
	Azumajishi		12.5	1.3	3.6		
4	21 cultivars**	Internodal stem*	4.7~22.0	1.4~2.3	1.7~3.6	MS	IAA 3.0 Kinetin 1.0

Culture environments: Day length; 16 hrs., light intensity; ca. 3,000 lux, temperature; 28°±1.5°C

* The internode between the 3rd and the 4th node below the youngest expanded leaf.

** See Table 4.

培養を始めて約1週間たつと、寒天面とは反対の植付け切片切断面や側面にカルスが生じはじめ、その後そのカルスからシュートが形成されてきた。形成されたシュートに2種類が観察された。一つは培養開始後比較的初期に発生し、全体が緑色水浸状で、1～数枚の細長い葉を叢生的に展開し、培養期間の経過にともなって次第に褐変枯死するシュートであり、アブノーマル・シュート (abnormal shoot) と呼ぶことにした (写真1)。他の一つは、アブノーマル・シュートよりも遅く発生し、全体が緑色不透明で比較的丸味を帯びた葉を展開し、節間が伸長し、将来土壌栽培可能なシュートであり、ノーマル・シュート (normal shoot) と名づけることとした (写真2)。ノーマル・シュートは単独で発生することはほとんどなく、アブノーマル・シュートが発生した切片に形成される場合が多かった。なお、アブノーマル・シュートのみを発生している切片でも適当な時期 (最適時期については検討中) に同種類の培地で継代培養するとノーマル・シュートが発生した。しかしながら、培養開始後8週間を経てもシュートや根を形成せず、しかも褐変していない切片、つまりカルスのみを生じた切片のほとんどは同じ種類の培地で継代培養してもシュートや根を形成しなかった。

なお、発生したノーマル・シュートのなかには帯化した茎をもつシュートがしばしば観察された。

根の形成については3種類のタイプが観察された。まず、培養初期に根が発生して、その根はよく伸長したが、シュートは全く形成されない場合があった (NAA 添加区)。つまり、根のみの形成に終った培養切片で、表で発根切片としたものである。次に、形成されたノーマル・シュートに関連して根が生じた場合があった。これらの根は培養後期に発生し、よく伸長した。更に、アブノーマル・シュートからもまれに根が生じていたが、これらの根はほとんど生長していなかった。

なお、培養開始後8週間経過してもノーマル・シュートに発根が認められない場合が少なかった。この発根していないシュートはさらにそのままの状態では培養を続けるか、シュートを切取って糖と生長調節物質を添加していないMS培地に植付けるか、あるいはバーミキュライトにさし芽して十分な管理を行うことによって容易に発根を促し、小植物を得ることができた。

培養切片の褐変については「実験方法」の項で述べたように、培養切片の取り扱いには注意を払ったにもかかわらず生じたことに留意したい。この場合は、培養した切片がカルスをほとんど生じることなく培養開始後間もなく褐変枯死している。この褐変切片の出現は、培地に添加した生長調節物質の種類・濃度・組合せにも関係があると考えられる。

次に、実験1～4について別々に器官形成の様相を記述する。

1. 3品種の節間茎横断切片の IAA および kinetin の単独あるいは組合せ添加処理に対する器官形成反応 (実験1, 2) [第2表]。

IAA 単独添加区：供試した3品種の茎横断切片の培養物にはシュートおよび根の発生は全く観察されず、「華陽の桜」の培養物を除いて「黄天ガ原」では約60%が、また「東獅子」では0.5, 1.0mg/l 区でほとんどの培養物が、3.0mg/l 区では約65%が褐変枯死した。

kinetin 単独添加区：3品種ともにシュートおよび根を発生した培養物は全く認められず、培養開始後約2週間のうちにほとんど褐変枯死した。

IAA と kinetin の組合せ添加区：「華陽の桜」の茎横断切片の培養物はすべての組合せ区でシュートの形成が認められたが、「黄天ガ原」では2.0 mg/l IAA+0.2 mg/l kinetin 区および5.0 mg/l IAA+1.0mg/l kinetin 区でそれぞれ1切片のみに観察された。「東獅子」ではいずれの組合せ区でもシュートの発生は認められなかった (写真3)。

IAA と kinetin の組合せ添加区でシュート発生切片数が多かった「華陽の桜」では、IAA の

Table 2. The effect of IAA and kinetin on organ formation of stem segments of 3 chrysanthemum cultivars.

Growth regulators	Kayō-no-sakura				Ki-amagahara				Azumajishi			
	No. of segments		No. of segments		No. of segments		No. of segments		No. of segments		No. of segments	
IAA mg/l	examined	with shoots	without shoots & roots	browned	examined	with shoots	without shoots & roots	browned	examined	with shoots	without shoots & roots	browned
0	0	15	0	15	15	0	8	7	15	0	0	15
	0.5	14	0	11	15	0	3	12	14	0	3	11
	1.0	15	0	14	15	0	0	15	15	0	0	15
	3.0	14	0	13	15	0	0	15	13	0	0	13
0.5	0	15	0	2	13	0	5	8	15	0	2	13
	0.05	15	3	12	14	0	9	5	15	0	15	0
	0.1	13	4	9	14	0	6	8	15	0	15	0
	0.25	15	8	7	14	0	8	6	15	0	15	0
1.0	0	13	0	11	15	0	6	9	15	0	1	14
	0.1	15	4	11	15	0	10	5	15	0	15	0
	0.2	13	5	8	13	0	8	5	15	0	15	0
	0.5	15	12	3	15	0	10	5	15	0	15	0
2.0	0.2	15	6	9	15	1	10	4	15	0	15	0
	0.4	15	13	2	15	0	10	5	15	0	15	0
	1.0	15	12	3	15	0	8	7	15	0	15	0
3.0	0	15	0	15	15	0	6	9	14	0	5	9
	0.3	15	13	2	15	0	11	4	15	0	14	1
	0.6	14	10	4	15	0	6	9	15	0	13	2
	1.0	15	13	2	15	0	5	10	15	0	14	1
	1.5	15	9	6	15	0	11	4	15	0	13	2
5.0	0.5	14	6	8	15	0	6	9	15	0	14	1
	1.0	15	12	3	15	1	5	9	15	0	15	0
	2.5	15	8	7	15	0	11	4	14	0	13	1

Table 3. The effect of NAA and kinetin on organ formation of stem segments of 3 chrysanthemum.

Growth regulators	Kayō-no-sakura			Ki-amagahara			Azumajishi		
	No. of segments			No. of segments			No. of segments		
NAA mg/l	examined	with shoots	without shoots & roots	examined	with shoots	without shoots & roots	examined	with shoots	without shoots & roots
0.1	0.01	14	0	0	14	15	15	0	15
	0.02	15	0	0	15	15	15	0	15
	0.05	15	0	0	15	15	15	0	15
0.5	0.1	15	1	0	14	14	15	0	15
	0.05	15	0	3	12	15	15	0	15
	0.1	15	1	9	5	15	15	0	15
1.0	0.25	15	1	0	14	15	15	0	15
	0.5	14	4	0	10	15	15	0	15
	0	15	0	0	15	15	15	0	15
3.0	0.1	15	0	12	3	15	15	0	15
	0.2	15	0	8	7	15	15	0	15
	0.5	15	3	1	11	15	15	0	15
3.0	1.0	15	4	0	11	15	15	0	15
	0.3	15	1	4	10	15	15	0	15
	0.6	15	0	1	14	15	15	0	15
3.0	1.5	15	2	0	13	15	15	0	15
	3.0	15	2	0	13	15	15	0	15

濃度が 0.5, 1.0mg/l の場合, kinetin 濃度がそれぞれの IAA 量の1/2を組合せた区が他の組合せ区よりもシュート発生切片数が多く, IAA の濃度が 2.0, 3.0, 5.0mg/l の場合, kinetin 濃度がそれぞれの IAA 量の1/2よりも低い組合せ区でシュート発生切片数が多い傾向があった。

根のみを発生した切片は3品種ともにいずれの区においても認められなかった。

2. 3品種の茎横断切片の NAA および kinetin の組合せ添加処理に対する器官形成反応(実験3) [第3表]。

NAA と kinetin を組合せて添加した MS 培地は,「華陽の桜」と「黄天ガ原」の茎横断切片の培養物にシュートの形成が認められ,「東獅子」の培養物では全く観察されなかった。「華陽の桜」のシュート発生切片数は NAA と kinetin が同濃度の組合せ区に多かった。「黄天ガ原」ではシュート発生切片数は少なく, シュートの発生が観察された組合せ区は NAA 濃度の低い 0.1, 0.5mg/l 区のみであった。

根の発生は, 供試した3品種の中で「華陽の桜」の培養物にのみ認められ, NAA 濃度に対して kinetin 濃度が1/2以下の濃度区で観察された。

褐変した切片はいずれの区でも全く認められなかった。

3. 21品種の茎横断切片の 3mg/l IAA+1mg/l kinetin 添加処理に対する器官形成反応(実験4) [第4表]。

供試した21品種のうち, 大輪系3品種では全くシュートの発生は認められなかった。切花用中

Table 4. The organ formation of stem segments of 21 chrysanthemum cultivars.

Form & type	Cultivars	No. of segments			
		examined	with shoots	without shoots & roots	browned
Large-flowered	Hyakunen-yuki	15	0	15	0
	Kōgen-no-kumo	15	0	12	3
	Ōtsunami	14	0	14	0
Medium-flowered	Asayume	15	0	15	0
Cut-flower use	Ginkaku	15	0	15	0
	Ginteki	15	0	15	0
	Matsu-no-yuki	10	10	0	0
	Mino-kogane	15	0	15	0
	Miyako-ume	14	0	14	0
	Nihonbare	14	1	13	0
	Oriflamme	14	0	13	1
	Seikō-bizan	14	1	13	0
	Motte-no-hoka	14	0	0	0
	Shimizu-no-ike	15	1	11	3
Higo-giku	Kasugahime	14	0	14	0
Ise-giku	Bibeni	15	15	0	0
Saga-giku	Saga-no-iori	14	0	13	1
Small-flowered	Ki-ari	14	13	0	1
Cut-flower use	Mura-no-takara	13	0	12	1
Bunjin-giku	Hatsuhinode	15	0	15	0
Cushion-mum	Red Star	15	4	6	5

輪系9品種の中でシュートの発生が認められた品種数は3品種で、他の6品種は全く認められなかった。シュートが発生した3品種の中でも1品種は植付け切片のすべてにシュートの発生が認められたが、他の2品種はそれぞれ1切片だけにシュートが観察された。中輪系5品種の中でシュートの発生が認められた品種数は2品種で、そのうち1品種はすべての切片に、他の1品種はわずかに1切片のみに認められた。また、小輪系では、4品種中2品種にシュートの発生が認められ、そのうち1品種はほとんどの切片に発生したが、他の1品種は発生切片数が少なかった。根だけを発生した品種は全く認められなかった。

IV. 考 察

キクの節間茎横断切片を培養した一連の実験によって、培養によるシュート形成の様相には著しい品種間差異があることがわかった。形成されるシュートに発根が伴わない限りは、組織培養によるキクの繁殖の将来性は期待できないわけであるが、この点に関しても、形成されるシュートに根を生じさせる方法が確かめられている。

なお、キクの組織培養において、器官形成の品種間差異の観察の他に、親株と染色体数の若干異なるシュートが形成されることが著者等のキクの組織培養に関する一連の実験で観察されており¹⁸⁾¹⁹⁾、キクの組織培養は育種の一手段としても役立て得ると思われる。育成した植物の急速な増殖のためにも、キクの繁殖手段として、その組織培養に関する基礎的諸条件を明らかにすることは必要である。ここに本報の培養条件下におけるキクの器官形成様相を分析考察して、上記の要請に答えたい。

培養下の器官形成の品種間差異について

植物は、環境条件の自然条件下の推移または人為的変更に応じて物質的・生理的に対応変化し、ひいては組織的・形態的变化すら示すに到るといえよう。その対応の仕方・様相は、植物の種類の間違に依存して異なっているであろう。この対応の仕方・様相の違いが、植物のもつ別の形質の間違と関連していないかどうかを知ること、およびそのような関連のある形質を探してみることは意義あることであろう。

植物の組織培養を行った場合に、培地の化学的・物理的相違や培養環境条件の相違に基づく器官形成反応の差異もあるわけであるが、供試植物の品種等の違いによっても異なることが観察されている。本実験ではキクの24品種について培養下の器官形成に関し明らかな品種間差異を認めたのであるが、下記のように、属、種、品種の異なる植物群にわたって現われる反応差を調査した報告もある¹⁾¹⁰⁾¹²⁾¹⁷⁾²⁰⁾。

Nataraja¹⁷⁾ はキンポウゲ科の4属4種の花芽および葯を培養し、*Ranunculus sceleratus* ではシュート、根および胚状体が、*Consolida orientalis* ではシュートと根が、また、*Delphinium brunonianum* ではいずれの器官も分化しなかったことを報告し、更にキンポウゲ科では胚状体の形成は1種のみしか認められなかったが、セリ科では多くの属に胚状体が形成されていることに触れ、胚状体形成能力は恐らく種の養分要求に関係のある遺伝的構成によると結論している。種間差異に関しては、KaulおよびSabharwal¹²⁾ は*Haworthia* 属の9種と1種間雑種の花軸切片と雌蕊を培養し、形態形成反応には種特異性は認められなかったと述べている。Iizukaら¹⁰⁾ は3品種のキクの筒状花を種々の培地で培養し、カルス形成は3品種間にわずかに差異があるにすぎなかったが、器官分化については、品種によって差異が認められたと述べ、器官分化に必要な光条件も品種によって異なると報告している。

植物の組織培養において、こうした器官形成の反応差が存在する理由や反応差が生じる原因に

については上記の文献もほとんど触れていない。この原因はそれ程簡単につきとめられることでもないであろう。

著者らは、こうした反応差の生じる原因を探究する一助として、この培養下の器官形成反応の相違が、供試品種のもつ「別の形質」の相違と関連していないかどうかについて考究してみた。

栽培ギクの分類法として、花（花序）の大小または花（花序）の数による区分が行われている。ここで問題としたい花序の数とは、一花序を構成する小花の数（これは花の大小に係わる一要素である）ではなくて、小花の集合体としてのいわゆる花の数であり、花序を頂生する茎の数ともいえるし、更には分枝の数ともいえる（後に詳述）。

さて、キクを大輪系、中輪系、小輪系などの系統に分けることがある。本報供試の24品種について、これら大輪系、中輪系、小輪系に分け、更に、その培養下の器官形成の程度をおおまかに類別してみると下表のようになる。

シュート発生切片	大輪系	中輪系	小輪系
多 い	0	3	1
少 ない	0	4	1
全くない	4	9	2

中輪系では16品種中7品種、小輪系では4品種中2品種、つまり両系統ともに供試品種の約半数がシュートを形成したが、大輪系にはシュートを形成した品種は全く認められなかった。

次に、花の大きさではなくて、上記の意味での花の数を採りあげて考えてみよう。

キクでは茎の長さに相違はあっても、茎の頂端に花序が頂生するから、花の数は花を頂生する茎の数ということになる。茎の数は、茎に着生する葉の葉腋にある腋芽が逐次生長を始め、伸長することによって増加する。

茎の頂端にある芽（頂芽）は、栄養生長過程にある時は、その頂端分裂組織の活動によって葉の幼原基を分化し、葉数を増す。葉の分化形成の進行のある段階で（植物の種類によって早晚がある）、その葉腋部に生長円錐を分化し、腋芽を形成するが、この腋芽がいつ生長を開始するかが問題となるわけである。

植物には、頂芽優勢性の著しいものと表現されている植物、すなわち、腋芽は休眠を続けて生長活動をせずにいわゆる一本立の草姿をなす植物と、頂芽優勢性の弱いものと規定されているもので、腋芽の休眠が浅くて容易に生長活動を始め、分枝の比較的多い姿をとる植物とがある。この頂芽優勢性の強弱は、植物が遺伝的にもつ分枝性の強弱ということでも表現されよう。つまり頂芽優勢性の強い植物とは分枝性の低いものであり、頂芽優勢性の弱い植物とは分枝性の高いものといえる。分枝性の低い植物も摘心（あるいは茎頂部の auxin の量的関係が茎頂部を摘除したのと同じ状態に導かれると考えられる花芽分化誘起ないし anti-auxin 的作用物質の適当な施用）によって、その強い頂芽優勢性が打破されて腋芽の生長活動が促され、分枝型草姿に導かれる。

ここで、花の大きさによって分けたキクの各種類について、その分枝性の強弱を概観してみると、大輪系は分枝性が極めて弱く（摘心しなければ腋芽不活動）。小・中輪系は分枝性が強い傾向があるといえよう。

組織培養におけるキクのシュート形成の品種間差異は、品種がもつ自然条件下の分枝性と関係があると考えられないだろうか。

分枝性の高いものとは、腋芽の生長活動が始まりやすいものであると規定したが、更に考えを一步進めて、分枝性の高いものでは分枝の基礎である腋芽の分裂組織の分化そのことが、つまり、生長円錐の新生性が細胞レベルで比較的に高いのではなかろうか。それが培養することによって

一層容易になるのではなからうか。

アブノーマル・シュートについて

キクの節間茎横断切片の培養において形成されたシュートに、栽培に移しうるノーマル・シュートの他にアブノーマル・シュートと名づけたシュートが存在していた。この2種類のシュートの関係には興味深いものがある。

ノーマル・シュートの形成は、アブノーマル・シュートそのものの生長の継続・発展として観察されているのではない。両シュートの出現は位置的に異なる培養物部分において観察されている。しかも一般的にアブノーマル・シュートがまず形成され、このアブノーマル・シュートが形成された培養物に、それとは異なった位置に時間的に遅れてノーマル・シュートが形成されている。つまり、ノーマル・シュートの形成にアブノーマル・シュートの形成が先行しているのである。

培養結果を調査表示した日（培養8週間後）にノーマル・シュートの形成が観察されていない培養物においても、アブノーマル・シュートが形成されている培養物には、時期的に遅れてノーマル・シュートの形成が期待できる。このことが実験的に確かめられている。

なお、上記調査日にノーマル・シュートだけしか観察できなかったまれな事例については、先行したアブノーマル・シュートの早期枯死消失が考えられよう。

アブノーマル・シュート形成の原因については、種々の推測ができるが（例えば、著者らの行った一連の実験結果—未発表—を考慮に入れての推測では、添加物質と培養物中の内生物質との相互作用）、今後の実験的検討をまって論究したい。

同一培地におけるシュート形成に関する茎横断切片の反応個体差について

同種類・同濃度の物質添加の培地上で、器官を形成した培養切片と無形成に終る切片とが存在した。この培養切片の反応個体差の傾向は NAA 添加区で著しいようである。

培養下の器官形成に関する切片の反応個体差の原因については Horák らの説⁹⁾（同品種内因子型不整一説）があるが、栄養繁殖性のキクには、この説を適用することはできない。

この反応個体差の原因検討のための一実験として、培養茎採取親株、その採取茎、更に同一茎での培養茎切り取り部位を異にする実験を行ったが、上記の個体差を説明するに足る実験結果は得られていない（未発表）。

シュート形成に関して培養切片の反応個体差が観察されたということは、組織培養における器官形成の様相を品種を異にする場合について比較検討することの他に、むしろそれに先立って、同一植物についての培養植物体部分の選択、その採取時期の選択の必要性を主張するものであるともいえよう。

この問題に関しては、茎頂、特に幼頭状花序培養を行った場合にシュート形成が著しく高まり、茎の横断切片の培養ではシュート形成の困難であった「黄天が原」や「東獅子」でもシュート形成が観察されていること（未発表）に注目したい。

組織培養下における器官形成の品種間差異については、先に、キクの茎の分枝性の品種間差異との関連を考えた。すなわち、頂端分裂組織として活動する生長円錐の新生が遺伝的要因に基いて容易であるようないわゆる分枝性の高い種類においては、組織培養という条件下では、この生長円錐の新生が一段と容易になるのではなからうかと考えた。

キクの幼頭状花序の培養の結果については、次のように考えられるのではなからうか。生長円錐の新生が次々に行われて小花が分化して行くように方向づけられたキクの幼頭状花序においては、培養条件下では、その多数の新生生長円錐が、培地条件に影響されて、一段と活発に葉芽としての生長活動を促されるようになるのではなからうか。

組織培養下の根の形成について

キクの茎横断切片培養において観察された根の形成については、3種類のタイプがあった。すなわち、培養下で形成されるシュートとは無関係に根が単独に形成された場合と、ノーマル・シュート形成に関連して、形成されたシュートから発根してきた場合、および、アブノーマル・シュートと関連してまれに発根し、ほとんど生長が認められない場合とである。

シュートとは無関係の単独発根事例は、培養初期に観察され、培養物に形成されたカルス自体から一次的に形成された直接的発根例である。この事例は、NAA添加区にのみ出現しており、この場合の培養切片は、発根のみを示すにとどまって、シュート形成を示さなかった。従って、この事例は組織培養によるキクの繁殖という面では価値がないわけである。しかし、これは、培養下で形成されたシュートとは無関係に生じたものであるから、培地に添加した生長調節物質の根の形成に関する直接的影響を物語っているともいえるわけで、この根の形成がNAA添加区に限られていたことも考慮に入れると、根の形成要因探究上注目すべきものである。

次に、ノーマル・シュート形成に関連している発根事例について考えてみたい。

IAA添加培地において、培養打切日までに、形成されたシュートからの発根が観察されたのであるが、その他に、培養8週間後にはノーマル・シュートだけが観察されるにとどまり、それからの発根は認められなかった事例も少なくなかった。もっとも、ここで留意したいことは、この段階における未発根シュートについては、培養継続ないしは継代培養、更にはバーミキュライトへのさし芽などによるシュートからの発根が観察されたことである。いずれにせよ、形成されたシュートから発根が実験的に期待できていることは、茎切片の培養による繁殖への利用を保証しているわけである。

さて、cytokinin/auxin ratio が高い培地で発根が阻害されている事例の報告は多い⁴⁾⁶⁾¹¹⁾。本実験では、培養8週間までに形成されたシュートからの発根が認められた場合も多かった。この場合の発根については、培地中の生長調節物質の直接的影響を考えるよりは、これらの物質の減量的変化(カルスやシュートによる吸収・光その他による分解)と形成されたシュートにおいて合成されると考えられる発根促進物質との総合影響を考えるべきではなかろうか。

組織培養下における器官形成に関する生長調節物質の質的・量的関係については、一般にシュート形成を促すといわれる物質の添加実験を行っている LaMotte および Lersten¹³⁾ の報告からその複雑性が示唆されており、結論を急がず、慎重に実験の積上げを待つべきであるといえよう。

摘 要

栽培ギクのインビトロでの器官形成に関する品種間差異を検討するために、3品種(中輪切花用の「華陽の桜」、*「黄天が原」*および大輪観賞用の「東獅子」)の節間茎横断切片を種々の濃度の IAA と kinetin の単独・組合せ添加の MS 培地で培養した。また、21品種の茎切片を 3mg/l IAA と 1mg/l kinetin を組合せて添加した MS 培地で培養した。結果は次の通りである。

1) IAA あるいは kinetin 単独添加培地では 3 品種ともに全く器官の形成は認められなかったが、IAA あるいは NAA と kinetin を組合せて添加した培地では「東獅子」を除く 2 品種でシュートの形成が認められた。「華陽の桜」の培養物は IAA と kinetin の 16 組合せすべての区でシュートが形成されたが、「黄天が原」では僅かに 2 組合せ区でシュートの形成が認められた。IAA の代りに NAA を kinetin と組合せて添加した場合にはシュートの形成はやや抑制されたが、根を発生した培養物が認められた。

2) 3mg/l IAA と 1mg/l kinetin を組合せて添加した MS 培地では、大輪系 3 品種は全くシュートを形成しなかったが、中輪系 14 品種中 5 品種に、小輪系 4 品種中 2 品種にそれぞれシュートの形成が認められた。根のみを発生した品種は全く認められなかった。

これらの結果は、培養下でのシュートの形成と自然条件下での分枝性との間に、ある関係が存在していることを示唆しているようである。

引用文献

- 1) Barba, R. and L. Nickell (1969). Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugarcane, a monocotyledon. *Planta* **89**: 299-302.
- 2) Ben-Jaacov, J. and R.W. Langhans (1972). Rapid multiplication of chrysanthemum plants by stem-tip proliferation. *HortScience* **7**: 289-290.
- 3) Butenko, R.G. (1964). *Plant tissue culture and plant morphogenesis*. Translated from Russian. Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem, 1968.
- 4) Earle, E.D. and R.W. Langhans (1974). Propagation of *Chrysanthemum in vitro*. I. Multiple plantlets from shoot tip and establishment of tissue cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **99**: 128-132.
- 5) Earle, E.D. and R.W. Langhans (1974). Propagation of *Chrysanthemum in vitro*. II. Production, growth, and flowering of plantlets from tissue cultures. *Ibid.* **99**: 352-358.
- 6) Grinblat, U. (1972). Differentiation of *Citrus* stem *in vitro*. *Ibid.* **97**: 599-603.
- 7) Hackett, W.P. and J.M. Anderson (1972). Aseptic multiplication and maintenance of differentiated carnation shoot tissue derived from shoot apices. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **90**: 365-369.
- 8) Halperin, W. (1969). Morphogenesis in cell cultures. *Ann. Rev. Plant Physiology* **20**: 395-418.
- 9) Horák, J., Lštinec, J., Měsíček, J., Kamínek, M. and D. Poláčková (1975). Regeneration of diploid and polyploid plants from the stem pith explants of diploid marrow stem kale (*Brassica oleracea* L.). *Ann. Bot.* **39**: 571-577.
- 10) Iizuka, M., Matsumoto, E., Doi, A., Madrigaland, R. and A. Fukushima (1973). Tubular floret culture of chrysanthemum and cineraria *in vitro*. *Japan. J. Genetics* **48**: 79-67.
- 11) Kartha, K.K., Gamborg, O.L. and F. Constable (1974). *In vitro* plant formation from stem explants of rape (*Brassica napus* cv. *Zephyr*). *Physiol. Plant.* **31**: 217-220.
- 12) Kaul, K. and P.S. Sabharwal (1972). Morphogenetic studies on *Haworthia*: Establishment of tissue culture and control of differentiation. *Amer. J. Bot.* **59**: 377-385.
- 13) LaMotte, C.E. and N.R. Lersten (1972). Attempts to obtain bacterial-free plants of *Psychotria punctata* (Rubiaceae): Growth and root formation in callus cultures. *Ibid.* **59**: 89-96.
- 14) Murashige, T. and R. Nakano (1966). Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. *J. Heredity* **57**: 115-118.
- 15) Murashige, T. and R. Nakano (1967). Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells. *Amer. J. Bot.* **54**: 963-970.
- 16) Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiology* **25**: 135-166.
- 17) Nataraja, K. (1971). Morphogenetic variation in callus cultured derived from floral buds and anthers of some members of *Ranunculaceae*. *Phytomorphology* **20**: 290-296.
- 18) 島田恒治, 宮崎貞巳, 田代洋丞 (1974). キクの茎切片培養に関する研究. (第1報) 培養によって生じた株の染色体調査. 園芸学会昭和49年度秋季大会研究発表要旨. 324-325.
- 19) 島田恒治, 宮崎貞巳, 田代洋丞 (1975). キクの茎切片培養に関する研究. (第2報) 茎頂, 茎および幼花序切片培養によって生じた株の染色体調査. 園芸学会昭和50年度秋季大会研究発表要旨. 364-365.
- 20) Watanabe, K., Nishi, Y. and R. Tanaka (1972). Anatomical observations on the high frequency callus formation from anther culture of *Chrysanthemum*. *Japan J. Genetics* **47**: 249-255.
- 21) White, P.R. and A.R. Grove Eds. (1965). *Proc. Int Conf. Plant Tissue Culture*. Berkeley, California.

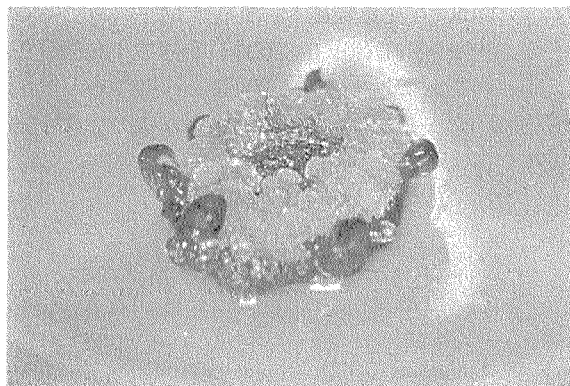


Fig. 1. 3-week-old culture of stem segment of "Kayō-no-sakura" showing developing abnormal shoot buds.

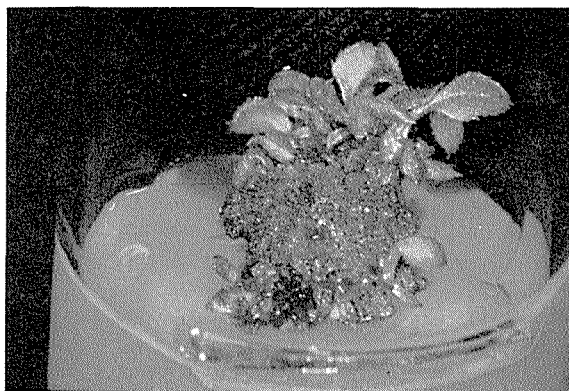


Fig. 2. 8-week-old culture of stem segment of "Kayō-no-sakura" showing developed normal shoots.

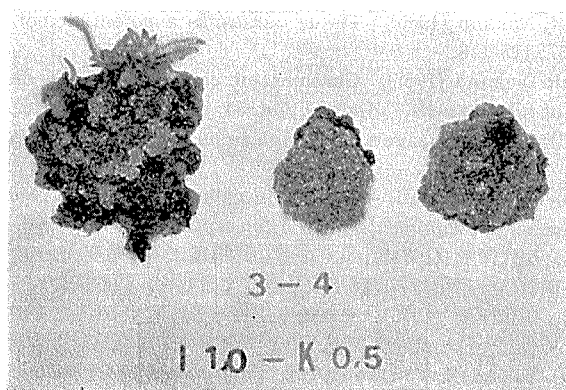


Fig. 3. Stem segments grown for 8 weeks on MS medium with 1.0 mg/l IAA+0.5 mg/l kinetin. From left to right; "Kayō-no-sakura", "Azumajishi", "Ki-amagahara".